

**PREPARATION OF SWEETENING MATTER**

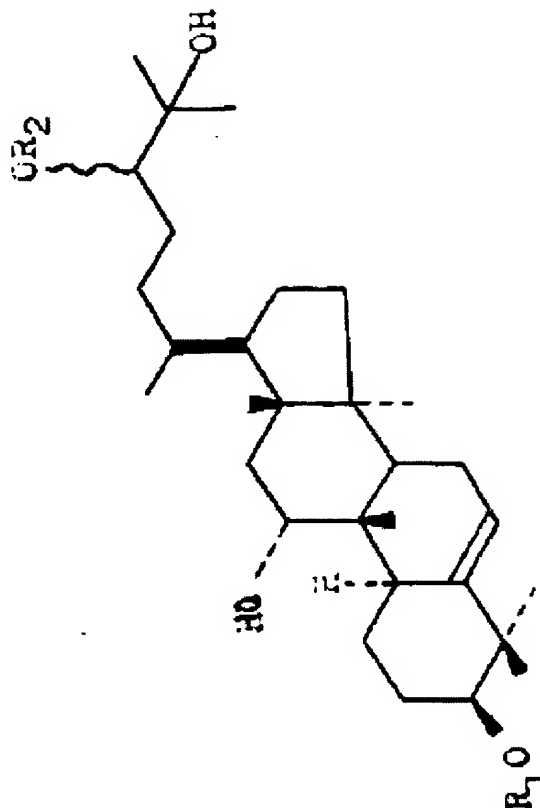
**Patent number:** JP57086266  
**Publication date:** 1982-05-29  
**Inventor:** MIYAKE TOSHIO  
**Applicant:** HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC; others: 01  
**Classification:**  
- **international:** A23L1/236  
- **europaean:**  
**Application number:** JP19800162362 19801118  
**Priority number(s):**

**Report a data error here**

**Abstract of JP57086266**

**PURPOSE:**To prepare a sweetening matter having good sweetness, by treating triterpene alcohol beta-glycoside with an alpha-glycosyl transferase so that it is converted into an alpha-glycosyl derivative.

**CONSTITUTION:**An aqueous solution comprising triterpene alcohol beta-glycoside shown by the formula (one or both of R1 and R2 are beta-D-glucose residue) obtained from *Momordica grosvenori* Swingle of a cucurbitaceous plant and an alpha-glycosyl saccharide compound, e.g., partial hydrolyzate of starch or sugar is treated with an alpha-glycosyl transferase, e.g., alpha-glycosidase, alpha-amylase, dextran sucrase, etc. to give a sweetening matter containing an alpha-glycosyl derivative of triterpene alcohol beta-glycoside. The enzyme is deactivated and used as a sweetener.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—86266

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 23 L 1/236

識別記号

庁内整理番号  
7236—4B

⑯ 公開 昭和57年(1982)5月29日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ 甘味物の製造方法

⑰ 特 願 昭55—162362

⑱ 出 願 昭55(1980)11月18日

⑲ 発 明 者 三宅俊雄

岡山市奉還町3丁目1番16号

⑰ 出 願 人 株式会社林原生物化学研究所  
岡山市下石井1丁目2番3号

⑱ 出 願 人 日本ケミカルリサーチ株式会社  
神戸市東灘区御影本町3丁目4  
番20号

明 細 書

1. 発明の名称

甘味物の製造方法

2. 特許請求の範囲

トリテルペンアルコールβ-グリコシドとα-グルコシル糖化合物とを含有する水溶液に、α-グルコシル糖転移酵素を作用させて、α-グルコシル化したトリテルペンアルコールβ-グリコシドを生成含有せしめることを特徴とした甘味物の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、甘味物の製造に際し、トリテルペンアルコールβ-グリコシドとα-グルコシル糖化合物とを含有する水溶液に、α-グルコシル糖転移酵素を作用させて、α-グルコシル化したトリテルペンアルコールβ-グリコシドを生成含有せしめることを特徴とした甘味物の製造方法に関するものである。

また、本発明は、モモルディカ・グロスベノリ・スウィングル (Momordica grosvenori Swingle)

から甘味物を製造するに際し、該植物の果実または葉をα-グルコシル糖化合物を含有する水溶液で抽出し、この抽出液にα-グルコシル糖転移酵素を作用させて、α-グリコシル化したトリテルペンアルコールβ-グリコシドを生成含有せしめることを特徴とした甘味物の製造方法に関するものである。

近年、ウリ科の多年生草木であるモモルディカ・グロスベノリ・スウィングルの果実または葉は、新しい甘味源として注目されている。

通常、この果実を加熱加工して得られる生薬羅漢果 (Fructus Momordicae) を抽出し、濃縮して黒褐色のエキス甘味料が製造されている。

このエキスには、特開昭52-83986号公報および特開昭53-34966号公報などに開示されているように、甘味グリコシドとして、トリテルペンアルコールβ-テトラグルコシド (分子式  $C_{51}H_{92}O_{24} \cdot 2H_2O$ 、通称 S-4 配糖体)、トリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシド (分子式  $C_{60}H_{102}O_{29} \cdot 2H_2O$ 、通称 S-5 配糖体)、トリテル

ペンアルコール $\beta$ -ヘキサグルコシド(分子式 $C_{66}H_{112}O_{34}$ 、通称S-6配糖体)などのトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドが含まれていることが知られている。

本発明者は、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの味質について検討したところ、

- (1) 甘味以外に、刺すような刺激性の味と、薬品臭を呈すること。
- (2) 甘味が砂糖よりも遅れて現われ、甘味以外に苦味、渋味が残り味として長く尾を引き、不快感を与えること。

などの欠点を有していることを見いだした。

そこで、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドにおけるこれらの欠点を、生化学的手段で解消することを目的に研究を続けた結果、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドと、例えばマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのマルトオリゴ糖、シクロデキストリン、D.E. 1~70の澱粉部分分解物、澱粉、更には砂糖などの $\alpha$ -グルコシル基を有する糖化合物、即ち $\alpha$ -

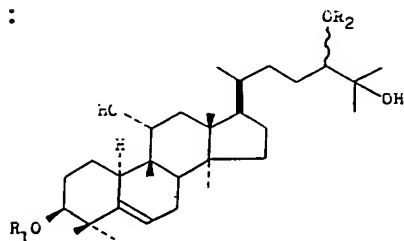
グルコシル糖化合物とを含有する水溶液に、これら $\alpha$ -グルコシル糖化合物から $\alpha$ -グルコシル基をトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドに転移しうる $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素、例えば $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)、 $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)、デキストランシュクララーゼ(EC 2.4.1.5)などを作用させて生成する $\alpha$ -グルコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有せしめて得た甘味物は、従来のトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド製品とは全く違って、

- (1) まろやかな甘味を呈し、刺激性の味、薬品臭を呈しないこと。
- (2) 甘味が尾を引かず、苦味、渋味が後に残らないこと。

などの甘味物として極めて優れた性質を有していることを見だし、本発明を完成した。

本発明で使用するトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドは、

式：



で示されるトリテルペンアルコールにおいて、 $R_1$ および $R_2$ は、一方が水素を意味し、他方が1以上の $\beta$ -D-グルコース残基を意味するか、または両方とも $\beta$ -D-グルコース残基を意味する化合物である。

換言すれば、トリテルペンアルコール $\beta$ -D-グルコースが等モル以上グルコシド結合しておればよく、一般にはモモディカ・グロスベノリ・スウィングルの果実または葉から抽出されるトリテルペンアルコール $\beta$ -テトラグルコシド、トリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド、トリテルペンアルコール $\beta$ -ヘキサグルコシドなどのトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド混合物が

用いられる。

また、場合によっては、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて個々のグリコシドを単離して使用することもできるし、これらグリコシドの部分分解物であるトリテルペンアルコール $\beta$ -モノグルコシド、トリテルペンアルコール $\beta$ -ジグルコシド、トリテルペンアルコール $\beta$ -トリグルコシドなどを用いることもできる。

本発明に用いる $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、同時に用いる $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素によって、トリテルペンアルコール $\beta$ -グルコシドから $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを生成するものであればよい。従って、 $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの生成を容易にするためには、 $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素に好適な基質、即ち澱粉部分分解物や、砂糖などの $\alpha$ -グルコシル糖化合物が選ばれる。

本発明に用いる $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素は、その酵素に好適な基質 $\alpha$ -グルコシル糖化合物と

トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドとを含有する水溶液に作用させるとき、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを分解せずに $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを生成するものであれば、自由に用いることができる。一般には、動物、植物、微生物由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)、 $\alpha$ -アマラーゼ(EC 3.2.1.1)、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)、デキストランシュクラーゼ(EC 2.4.1.5)、デキストリンデキストラナーゼ(EC 2.4.1.2)、アミロシュクラーゼ(EC 2.4.1.4)などが $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素として有利に用いることができる。

これらの $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素は、前記の条件を満足しさえすれば、必ずしも精製して使用する必要はなく、通常は粗製品で本発明の目的を達成することができる。また、固定化された $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素をバッチ式で反応に繰返し利用することも、連続式で反応に利用することも

$\alpha$ -グルコシル糖転移酵素を作用させれば容易に $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを生成することを見いだした。

この際、抽出時に $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素を共存させ、抽出と酵素反応とを平行して行ない抽出の促進と、抽出、反応に要する時間の短縮を計ることができる。

これらの方法によれば、比較的夾雑物の混入の少ない状態で $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有する甘味物が生紫羅漢果から直接製造することができるので極めて有効である。

本発明では、目的によっては反応液をそのままでも甘味物として使用できるが、必要に応じて、反応後に酵素を加熱失活させ、例えば本発明者らが先きに出願した特願昭55-19741号の明細書に示したケイ酸アルミン酸マグネシウム、また特願昭55-60502号の明細書に示したマグネシア系吸着剤で有色夾雑物を吸着除去し、その非吸着部分を採取して甘味物とするか、更にはイオン交換樹

自由にできる。

本発明の反応条件は、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する水溶液に $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素を反応させることができればよい。通常、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドは、水に溶解して反応液中の濃度を約0.1~20 w/w %とし、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物の濃度を約1~50 w/w %とすればよく、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドに対する $\alpha$ -グルコシル糖化合物の比率は、固形物当たり約0.5~500倍の範囲が好ましい。

反応液のpHと温度は、 $\alpha$ -グルコシル糖転移酵素が反応して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを生成できればよく、通常pH 3~10、温度20~80℃の範囲から選ばれる。

また、本発明者は、羅漢果からグリコシドを抽出する際に $\alpha$ -グリコシル糖化合物を含有する水溶液で抽出すれば、夾雑物の混入が比較的少ない状態で目的とするグリコシドが高収率で抽出でき、次いで、この抽出液に直接、または濃縮した後に

脂(例えば、H型強酸性イオン交換樹脂、OH型弱塩基性イオン交換樹脂)を用いて脱塩し、これを濃縮してシラップ状の甘味物とするか、更には乾燥粉末化して粉末状の甘味物とすることもできる。

また、この甘味物から糖類とグリコシドとを分離する必要がある場合には、合成吸着剤、例えばMP-10(三菱化成工業株式会社製)、アンバーライトXAD-2(ローム&ハース社製)などを充填したカラムに通液すれば、 $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドは吸着され、糖類は吸着されずに流出する。吸着されたグリコシドは、該カラムに低級アルコール水溶液、例えば50 v/v %メタノール水溶液を通液することによって容易に溶出され、この溶出液を濃縮してシラップ状甘味物とするか、更に乾燥、粉末化して粉末状の甘味物とすることができる。

このようにして得られる本発明の甘味物における甘味度は、一般には、反応に用いたトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの固形物重量に見合

う甘味度とほぼ同程度か、やや低い程度である。

また、その甘味の質は、粉末状のものをそのまま口に含んでも薬品臭、刺激味、苦味、渋味などの嫌味を呈することなく、まろやかな甘味を呈し、残り味の切れもよい。

また、本発明の $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有するシラップ状甘味物は、長期保存しても $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド、および未反応のトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの析出が見られなかった。

また、本発明の $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有する粉末状甘味物は、それに含まれる各グルコシド化合物が互いに溶け合ったいわゆる固溶体の粉末である。従って、この粉末の水に対する溶解速度は、瞬時に溶解できる程大きく、しかもその溶解度には際限がないのでシラップ状からペースト状になる程の高濃度にも自由に溶解することができる。

本発明の甘味物は、そのまま甘味付のための調

味料として使用することは勿論、必要に応じて他の甘味物、例えば水飴、ブドウ糖、麦芽糖、カップリングシュガー（登録商標、林原株式会社）、乳糖、異性化糖、砂糖、ソルビトール、マルチール、ステビオシド、ジヒドロカルコン、グリチルリチン、L-アスパラチルフェニルアラニン、グリシン、アラニンなどと混合して使用することもできる。

また、本発明の甘味物は、虫歯原因菌などによって酸酵されにくいことから虫歯を起しにくい甘味剤として、さらには代謝されにくいことから低カロリー甘味剤としても利用できる。

また、本発明の甘味物は、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので飲食物、嗜好物、菓子類などへの甘味付に、また呈味の改良に利用することもできる。

また、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために、餌料、飼料の嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。

その他、本発明の甘味物は、タバコ、練歯みがき、口紅、リップクリーム、内服薬、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香錠、うがい薬などの各種固形状、ペースト状、液状嗜好物、化粧品、医薬品などへの甘味剤、呈味改良剤、矯味剤としても利用できる。

さらに、本発明の甘味物を生薬羅漢果と同じ薬効用途、すなわち清熱、潤肺、祛痰、咳止めなどの用途にも使用することができ、例えば咳止めシロップ、ぜんそくの発作をおさえる錠剤などとして使用できる。

次に、本発明の甘味物を実験に基づいて説明する。

#### 実験 1. 甘味物の調製

##### 1-1 グルコシル転移酵素の調製

バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) FERM-P No.2222 を 1 w/v %、リン酸カルシウム、ソリュブルスターチ 2 w/v %、硝酸アンモニウム 0.1 w/v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05 w/v %、コーンステアープリカー 0.5 w/v %、炭酸カ

ルシウム 1 w/v % からなる殺菌した液体培地 10 L に接種し、50℃で3日間通気攪拌培養した。得られた培養液を遠心分離して、その上清を硫酸 0.7 飽和で塩析し、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.19) の活性約 80,000 単位を有する粗酵素標品を得た。ここでいう活性 1 単位とは、pH 5.5、0.02 M の酢酸緩衝液及び  $2 \times 10^{-3}$  M の塩化カルシウムを含む 0.3 w/v % のソリュブルスターチ溶液 5 ml に、適当に希釈した酵素液 0.2 ml を加え 40℃で 10 分間反応させた後、その反応液 0.5 ml をとり、0.02 N-硫酸水溶液 15 ml に混合して反応を停止させ、さらにこの反応停止液に 0.1 N ヨウ素ヨウ化カリウム溶液 0.2 ml を加えて発色させ、ついて 660nm における吸光度を測定して、40℃で 10 分間反応させることによりソリュブルスターチ 15 量のヨウ素の呈色を完全に消失させる酵素量をいう。

##### 1-2 酵素反応

シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて単離

したトリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド(S-5配糖体)30gとマルトデキストリン(D.E. 18)90gとを水100mlに加熱溶解した後、60℃に冷却し、ついで前述の粗シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ標品の600単位を加え、pH 6.0とし、60℃で4時間反応させた。

この反応液を95℃に10分間保って酵素を加熱失活させた(この標品は、第1表の試料No 3に相当する。)後、戸過して得た戸液をマグネシア系吸着剤で脱色し、ついでイオン交換樹脂、アンバーライト IR-200C(H型)およびアンバーライト IRA-93(OH型)を通して脱塩した。ついで、これを70℃以下で減圧濃縮し、乾燥粉末化して粉末甘味物(この標品は、第1表の試料No 4に相当する。)を得た。

対照品は、同様に加熱、溶解した後、反応工程、加熱失活工程までを経たもので、その配合組成は第1表に示す。

第1表

試料	No 1 (対照品)	No 2 (対照品)	No 3 (本発明品)	No 4 (本発明品)	組成	備考
	トリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド 30 g	トリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド 30 g + マルトデキストリン 90 g	トリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド 30 g + マルトデキストリン 90 g + 600単位の酵素標品	トリテルペンアルコール $\beta$ -ペンタグルコシド 30 g + マルトデキストリン 90 g + 600単位の酵素標品	600単位の酵素標品 を予じめ加熱失活させたもの	試料No 3を精製して乾燥して得た粉末甘味物
	反応後、加熱失活させて得た液状甘味物	反応後、加熱失活させて得た液状甘味物	反応後、加熱失活させて得た液状甘味物	反応後、加熱失活させて得た液状甘味物		

## 実験2. 甘味の質の比較テスト

予備テストで求めた甘味度から算出して、各試料を15%の砂糖水溶液に相当する甘味度の水溶液を調製した。そして最も劣っているものと、最も優れているものを各1つずつ選出させ、かつ味質について意見を求めた。その結果は、第2表に示す通りであった。

第2表

判定	No 1 (対照品)	No 2 (対照品)	No 3 (本発明品)	No 4 (本発明品)
最も優れている。	0	0	7	13
最も劣っている。	12	8	0	0
味質	甘味以外に舌を刺すような刺激性の味がある。 薬品臭がある。 甘味以外に苦味、渋味が残り味として長く尾を引く。 直接使用は困難。		甘味がまろやかである。 甘味は砂糖に近い。 刺激味、薬品臭、苦味、渋味がない。 残り味の切れがよい。 直接使用にも好適。	

第2表の結果から、試料No 1、No 2の対照品は、甘味の質が劣っており、これに対し試料No 3、No 4の本発明品は、甘味の質が優れている。

従って、本発明の $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドは、従来のトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド、またはトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドと他の甘味物との単なる混合物などとは違って、嫌味がなく、まろやかで砂糖に近い甘味を有しており、しかも残り味の切れもよいことから、そのまま口にふくんで甘味を味わうことのできる極めて優れた甘味物である。

## 実験3. $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの確認

実験1-2で調製した試料No 4の10gを水100mlに溶解して得られる溶液を合成吸着剤(三菱化成株式会社製の商品名 HP-20)100mlのカラムに通液した後、充分水洗して糖類を除去した。次いで、このカラムに50%エタノール300mlを通過してグリコシドを溶出し、濃縮、

乾燥して約 2.6 g の粉末(試料No 5)を得た。

この試料No 5は、水に極めてよく溶け、まろやかな甘味を有する無臭、無色透明な中性の物質である。また、メタノール、エタノール、n-ブタノールなどの低級アルコールには一部溶け、クロロホルムやエチルエーテルには難溶性の物質である。

試料No 5のKBr錠剤法による赤外線吸収スペクトルを図に示した。

試料No 5の一部を少量の水に溶解した溶液に市販の結晶グルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3.)を0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.8)に溶解した溶液を加え、50℃で作用させて経時的にサンプリングし、シリカゲル60薄層(メルク社製)にスポットし、展開溶媒、酢酸エチル:メタノール:水=5:3:1の混合溶媒で上昇法で展開された。これを乾燥した後、40 w/v 塩化ケイタンゲステン酸エタノールを噴霧して加熱し発色させた。

また、試料No 1、No 5およびD-グルコースと

をスポットして比較して見た。

その結果、試料No 5には、試料No 1のトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドに相当するRf 0.65のスポット以外にRf 0.47、Rf 0.33、Rf 0.15および原点近くに新しいスポットが確認できた。これらの新しいスポットは、トリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドと同様に紫紅色であった。

また、試料No 5にグルコアミラーゼを作用させ、経時的にサンプリングしたものは、反応時間とともに徐々に新しいスポットが分解を受けて最終的には紫紅色を呈するトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシド(Rf 0.65)と褐色を呈するD-グルコース(Rf 0.60)とに分解されることが判明した。

以上の事実から、Rf 0.47、Rf 0.33、Rf 0.15などを示す新しい物質はトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドにD-グルコースが等モル以上α-グルコシド結合していることが判断される。従って、試料No 5は、α-グル

コシル糖転移酵素によって新たに生じたRf 0.47、Rf 0.33、Rf 0.15および原点近くのスポットを示す物質と少量の未反応のトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドとの混合物である。

また、Rf 0.47、Rf 0.33、Rf 0.15などを示す新物質は、豚の肝臓から抽出し、部分精製されたα-グルコシダーゼの作用によっても同様にトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドとD-グルコースとに分解されることが判明した。このことから、これら新物質は、人や動物が摂取するとき、体内でトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドとD-グルコースとに容易に分解されることを示唆している。

また、試料No 5は、実験2で使用した試料No 3および試料No 4と同様に優れた甘味を有していること、残り味の切れのよいことから、本発明のα-グリコシル化したトリテルペンアルコールβ-グルコシド甘味物として好適である。従って、本発明のトリテルペンアルコール

グルコシドの欠点を解消するという目的は、トリテルペンアルコールβ-グルコシドとα-グルコシル糖化合物とを含有する水溶液にα-グリコシル糖転移酵素を反応させてα-グリコシル化したトリテルペンアルコールβ-ペンタグルコシドを生成せしめることによって達成されるものと判断される。

次に、2~3の実施例について述べる。

#### 実施例 1.

パチルス・メガテリウム FERM-P No 935を実験1-1の培地5 Lに植菌し、28℃で3日間通気攪拌培養した。培養終了後、遠心分離して得た上清に硫酸を0.7飽和にし、更に遠心分離して沈殿を採取した。

この沈殿は、実験1-1に記載する活性測定方法でシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)を30万単位含んでいた。

羅漢果の破砕物500 gをデキストリン(D.E.20)の5 w/v 温水溶液1.5 Lで1時間抽出した。抽

出液を分離し、その残渣をさらに同溶液で抽出した後、最後に温水で洗浄抽出し、全抽出液を合せて濾過した後、固形物濃度約30%まで濃縮し、この濃縮液に前記シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ 3,000単位を加え、 $pH$  5.5、温度50℃で16時間作用させた。反応終了後、酵素を加熱失活させて濾過し、次いでケイ酸アルミン酸マグネシウム（富士化学工業株式会社製、商品名 ノイシリン）を充填したカラムを通液して有色夾雑物を吸着除去し、その非吸着部分を濃縮して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有するシラップ状甘味物約270gを得た。

本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約2倍であって、甘味の質もまろやかであり、残り味の切れもよい。

従って、本甘味物は、各種飲食物、嗜好物など多方面への甘味付けに利用することができる。特に、虫歯原因菌によって水不溶性のグルカンが生産されないことにより、虫歯を予防する甘

味の切れもよい。

本甘味物は、各種の甘味源として利用することができるが、中でも虫歯を予防する甘味料、低カロリー甘味料として好適である。

#### 実施例 3.

マルトース 4 w/v %、磷酸1カリウム 0.1 w/v %、硝酸アンモニウム 0.1 w/v %、硝酸ナトリウム 0.1 w/v %、硫酸マグネシウム・7水塩 0.05 w/v %、塩化カリウム 0.05 w/v %、ポリペプトン 0.2 w/v %、炭酸カルシウム 1 w/v %（別に乾熱滅菌し、接種時に無菌的に添加した。）からなる培地 5Lにムコール・ヤバニカス（*Mucor javanicus*）を接種して、30℃で44時間通気攪拌培養した。この培養液から得られた湿菌体 480gにM/2酢酸緩衝液（ $pH$  5.3）に溶解した4M尿素液 5Lを加え、30℃で40時間静置した。この上清を流水中で一夜透析した後、硫酸 0.9飽和として4℃で一夜放置し、次いで遠心分離して沈澱を採取した。この沈澱を酢酸緩衝液（ $pH$  6.0）100mlに懸濁

味物として効果的に利用できる。

また、このシラップ状甘味物は、そのままで清熱、潤肺、祛痰、咳止め用に好適である。

#### 実施例 2.

羅漢果の破砕物 500gに $\beta$ -シクロデキストリン 2.5 w/w %および実験1-1で得たシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ 5,000単位を加えた水溶液 2Lを $pH$  5.5、温度60℃に5時間保って抽出と酵素反応とを行った。反応終了後、濾過して得られる濾液にマグネシア系吸着剤（北海道曹達株式会社製、商品名 M-511）30gを加え、徐々に攪拌しつつ30分間保った後濾過し、得られる濾液をイオン交換樹脂アンバーライト IR-120 R（H型）およびアンバーライト 1RA-94（OH型）のカラムに通液して脱塩し、更に濃縮して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有するシラップ状甘味物約200gを得た。本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約4倍であって、甘味の質もまろやかであり、残り

した後、遠心分離し、上清を $\alpha$ -グルコシダーゼ（EC 3.2.1.20）液とした。

羅漢果軟エキス（日本商事株式会社製）150gとD.E. 40のマルトデキストリン 300gとを水 500mlに溶解し、前記の $\alpha$ -グルコシダーゼ液を加え、 $pH$  6.0、温度50℃で24時間反応させた。反応終了後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例1と同様に夾雑物を吸着除去し、濾液を濃縮、乾燥、粉末化して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有する粉末甘味物を固形物収率約97%で得た。

本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約2倍であって、甘味の質もまろやかで残り味の切れもよく、実施例1と同様に、飲食物、嗜好物だけでなく、薬効用途にも有利に利用できる。

#### 実施例 4.

水 1Lにバレイシ、澱粉 300gと羅漢果軟エキス 300gとを加え、これに細菌糖化型 $\alpha$ -アミラーゼ（EC 3.2.1.1）（生化学工業株式会社製）を実験1-1の方法による活性測定方



法で澱粉グラム当り10単位加え、80℃になるまで攪拌しながら加熱し、澱粉の液化が終ったところで60℃に冷却し2日間反応を続けた。この反応液を加熱して $\alpha$ -アミラーゼを失活させた後、実施例3と同様に精製し、減圧濃縮した後、粉末化して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有する粉末状甘味物を固形物収率95%で得た。

本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約2倍であり、甘味の質もまろやかで、残り味の切れもよく、実施例1と同様に飲食物、嗜好物だけでなく、薬効用途へも有利に利用できる。

#### 実施例 5.

羅漢果1kgを破砕し、これに3Lの熱水を加えて4回抽出し、得られた抽出液を合わせて実施例2に準じてマグネシア系吸着剤で夾雑物を吸着除去した後、非吸着部を合成吸着剤（アンバーライト XAD-7）400mlのカラムに通液し、溶液中に含まれるグリコシドを吸着させ、糖類溶液を流出させた。次いで、このカラムを水洗

でなく、低カロリー甘味物として、さらには他の甘味物、例えば麦芽糖、マルチトール、カップリングシュガー（登録商標 林原株式会社製）などの甘味度の強化に利用できる。

また、消熱、潤肺、祛痰、咳止めなどの用途に、そのまま、または他の薬剤と併用して粉剤、顆粒剤、錠剤として利用できる。

なお、本実施例の前記培地からトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを除いた培地に、ロイコノストック・メセンテロイデス IAM 1151を同様に培養して得た培養液を遠心分離し、得られた上清にリン酸カルシウムゲルを加えて透析し、次いで遠心分離してリン酸カルシウムゲルを採取した。

このゲルを硫酸0.35飽和の0.2Mリン酸モノナトリウム溶液に懸濁して溶出し、濃縮して得たデキストランシュクラゼ（EC 2.4.1.5）溶液10mlを、砂糖4w/v%と先きに調整したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド 1w/v%とを含有する溶液 200mlに加えて、pH 5.3、

した後、50 v/v%メタノール水溶液1Lを通液してグリコシドを溶出し、濃縮、乾燥してトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの白色粉末約4.6gを得た。

砂糖 5 w/v%、酵母エキス 0.5 w/v%、リン酸1カリウム 0.8 w/v%、リン酸2カリウム 2.4 w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩 0.02 w/v%、硫酸マンガシ 0.002 w/v%、前記トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド 1 w/v%を含有する培地 200mlにロイコノストック・メセンテロイデス（*Leuconostoc mesenteroides*）IAM 1151の種培養液を接種し、25℃で24時間培養した。本培養液を遠心分離して得た上清を、実施例1の反応液と同様に精製して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペン $\beta$ -グリコシドを含有するシラップ状甘味物約15gを得た。

本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約20倍であり、甘味の質もまろやかで、残り味の切れもよい。

本甘味物は、飲食物、嗜好物への甘味付けだけ

温度30℃で10時間作用させた。反応終了後、マグネシア系吸着剤で夾雑物を吸着除去し、得られる非吸着部を実験1-3に準じて合成吸着剤（アンバーライト XAD-7）のカラムに通液し、該カラムを水洗し、次いで50 v/v%エタノール水溶液でグリコシドを溶出回収し、これを濃縮、乾燥して $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドを含有する粉末状甘味物約2.5gを得た。

本甘味物は、固形物当りの甘味度が砂糖の約80倍であり、甘味の質もまろやかで、残り味の切れもよい。

本甘味物は前記と同様に各種の用途に利用できる。

本甘味物に含有する $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドは、イソマルトデキストラナーゼ（EC 3.2.1.94）によって分解され、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシド、 $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドなどともイソマル

トースを生じたことから、トリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドにD-グルコースが等モル以上 $\alpha$ -グリコシド結合している混合物であると判断される。

#### 4. 図面の簡単な説明

図は、 $\alpha$ -グリコシル化したトリテルペンアルコール $\beta$ -グリコシドの赤外線吸収スペクトルである。

特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原



日本ケミカルリサーチ株式会社

代表者 芦 田

